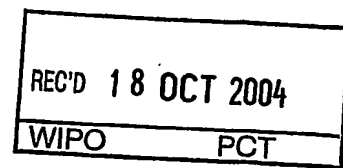


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 43 365.1

Anmeldetag: 17. September 2003

Anmelder/Inhaber: BioSphings AG,
51377 Leverkusen/DE

Bezeichnung: Pharmazeutische Formulierungen von
Xanthogenaten und Hemmstoffen der viralen
Nukleinsäurereplikation

IPC: A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. September 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

Pharmazeutische Formulierungen von Xanthogenaten und Hemmstoffen der viralen Nukleinsäurereplikation

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Formulierungen von Xanthogenaten in Kombination mit Hemmstoffen der viralen Nukleinsäurereplikation und Mittel, die diese Formulierungen enthalten, zur Behandlung von Viruserkrankungen.

Xanthogenate, insbesondere Tricyclodecan-9yl-xanthogenat (D609), sind als Substanzen mit antiviraler und antitumoraler Aktivität bekannt, z.B. aus „DNA and RNA virus species are inhibited by xanthates, a class of antiviral compounds with unique properties“ Sauer-G; Amtmann-E; Melber-K; Knapp-A; Muller-K; Hummel-K; Scherm-A, in Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1984 Jun; 81(11): 3263-7; “Selective killing of tumor cells by xanthates” Amtmann-E; Sauer-G, in Cancer-Lett. 1987 Jun; 35(3): 237-44 und U.S. Patent No 4, 602, 037.

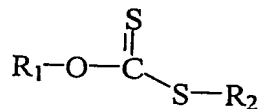
Die pharmazeutische Verwendung von antiviral und antitumoral wirksamen Xanthogenaten stößt auf das Problem, dass relativ hohe Wirkstoffkonzentrationen benötigt werden, um im Tiermodell Wirksamkeit zu zeigen. Da die Konzentration des Wirkstoffes sowohl aus pharmakologischen als auch aus technischen Gründen begrenzt ist, kann selbst bei den höchsten einsetzbaren Konzentrationen nur ein begrenzter Heileffekt erzielt werden. Das gleiche Problem betrifft die gebräuchlichen antiviralen Hemmstoffe wie Aciclovir, Valaciclovir oder Famciclovir.

Wir haben überraschend gefunden, dass durch eine Kombination von Xanthogenatderivaten wie D609 mit Hemmstoffen viraler Nukleinsäurereplikation wie Aciclovir eine synergistische Wirkungssteigerung eintritt. In Anwesenheit von niedrigen, antiviral unwirksamen Konzentrationen des Xanthogenats wurde eine bis zu fünffach höhere Wirkung von Aciclovir in der Zellkultur beobachtet. Im Tierversuch konnte durch die Kombination von D609 und Aciclovir das Überleben

aller mit HSV-1 infizierter Tiere erreicht werden. Jeder Wirkstoff für sich alleine appliziert bewirkte nur eine Teilheilung.

Die vorliegende Erfindung löst somit das oben genannte Problem, indem eine pharmazeutische Formulierung bereitgestellt wird, die ein Xanthogenat und einen Hemmstoff viraler DNA- oder RNA-Replikation enthält.

Die Formulierung enthält ein Xanthogenat der allgemeinen Formel I



wobei R₁ für einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Alkylrest steht. Vorzugsweise steht R₁ für einen Adamantyl-, Norbornyl-, Tricyclodecyl-, Benzyl-, geraden oder verzweigten C₃-C₂₀-Alkyl-, C₃-C₂₀-Cycloalkyl-, Furyl-, Pyridyl-, Anthracyl-, Naphtyl-, Phenanthryl-, Perinaphtyl- oder Chinuclidinyl-Rest, wobei der obengenannte gerade oder verzweigte C₃-C₂₀-Alkylrest durch eine Hydroxyl-, eine C₁-C₄-Alkoxygruppe, ein Halogenatom oder eine Aminogruppe und der obengenannte C₃-C₂₀-Cycloalkylrest ebenfalls durch eine Hydroxyl-, eine C₁-C₄-Alkoxy- oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe, ein Halogenatom oder eine Aminogruppe substituiert sein können. Besonders vorteilhaft für R₁ sind Cyclododecyl-, Dodecyl-, Undecyl-, Decyl-, Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-decyl-, nonyl-, octyl-, Bicyclo[2,2,1]-heptyl-, Cyclohexyl-, Hexyl-, Toluoyl- Reste. Ganz besonders vorteilhaft ist ein Exo/Exo-Tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-decylrest.

R₂ stellt ein Metallatom, eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Alkoxy-, Amino- oder Ammoniumgruppe oder Halogen dar. Vorzugsweise steht R₂ für ein ein- oder mehrwertiges Metallatom, einen geraden C₁-C₆-Alkylrest, einen durch Hydroxy substituierten C₁-C₆-Alkylrest, einen C₁-C₆-Alkoxyrest, eine Aminogruppe, einen C₁-C₆-Alkylaminorest, einen Di-(C₁-C₆-Alkyl)-Aminorest, einen Tri-(C₁-C₆-Alkyl)-

ammoniumrest, ein Halogen, 2,3-Dihydroxypropyl oder Hydroxy-(C₁-C₆-alkoxy)-methyl. Besonders vorteilhaft sind Natrium- und Kalium-Salze sowie Dimethylglycyl- und Methylester.

Der Hemmstoff viraler Nukleinsäurereplikation ist bevorzugt ein Nukleosid-analogon, und besonders vorteilhaft Bromdesoxyuridin (BudR), Fluordesoxyuridin (FudR), Aciclovir, Valaciclovir, Penciclovir oder Famciclovir.

Der Hemmstoff viraler Nukleinsäurereplikation kann auch ein Hemmstoff viraler Helikase sein.

Der Hemmstoff viraler Nukleinsäurereplikation kann auch ein Hemmstoff eines zellulären Enzyms sein.

Formulierungen, in denen pro ein Teil Xanthogenat 0,1 bis 10 Teile Hemmstoff viraler Nukleinsäurereplikation enthalten sind, haben sich als gut geeignet erwiesen. Besonders vorteilhaft ist ein Verhältnis von Xanthogenat zu Hemmstoff viraler Nukleinsäurereplikation von 1:1.

Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße Formulierung zusätzlich ein ionisches Detergens als wirkungsverstärkendes Adjuvans, wie es in der US 4,851,435 beschrieben ist. Als Adjuvans ist eine Fettsäure mit 6 – 19 C-Atomen oder deren Salz besonders bevorzugt. Insbesondere bevorzugt sind die Kaliumsalze der Decan-, Undecan- oder Laurinsäure. Das die Aktivität erhöhende Adjuvans kann auch ein Sulfat mit einem aliphatischen Rest von 8-18 C-Atomen sein. Besonders bevorzugt ist Na-Laurinsulfat. Weiter kommt für das Adjuvans Deoxycholinsäure oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon oder eine Phosphonsäure in Betracht.

Es ist weiterhin bevorzugt, das Xanthogenat gemäß WO 96/14841 in Lipid- oder Steroid-basierende Trägersubstanzen zu Inkorporieren. Die Einbringung in eine Trägersubstanz verbessert die Verträglichkeit der Mittel. Die Trägersubstanz ist hierbei insbesondere ein Steroid wie Cholesterin, Cholestanol, Cholansäure, Chondrillasterol und α , β , γ Sisterol.

Besonders bevorzugt werden Xanthogenat und gegebenenfalls Adjuvans entsprechend der DE 101 17 728 mit der Trägersubstanz vermischt. Ganz besonders bevorzugt ist Cholesterin. Als Trägersubstanz eignen sich auch Phospholipide, insbesondere Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol oder Stearylamin.

Besonders bevorzugt ist eine Formulierung, die Aciclovir, das Na- oder K-Salz der Decansäure und das Exo/Exo-Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-9yl-xanthogenat enthält. Insbesondere kommen auf einen Teil Xanthogenat ein Teil Kaliumsalz der Decansäure und ein Teil Aciclovir.

Eine weitere besonders bevorzugte Formulierung enthält Phosphatidylcholin oder Cholesterin, das Na- oder K-Salz der Decansäure, Exo/Exo-Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-9yl-xanthogenat und Aciclovir. Insbesondere kommen auf einen Teil Xanthogenat ein Teil Decansäure, vier Teile Phosphatidylcholin oder Cholesterin und ein Teil Aciclovir.

Die vorliegende Erfindung stellt gemäß Ansprüchen 11 bis 16 weiterhin Mittel zur Behandlung von Virus-, Tumor- oder Autoimmunerkrankungen bereit, die die pharmazeutische Formulierung enthalten. Die Mittel enthalten weiterhin übliche Trägersubstanzen und/oder übliche Hilfsstoffe. Es können auch weitere Wirkstoffe enthalten sein, soweit sie weder die Wirkung noch die Stabilität der Xanthogenate und der Hemmstoffe viraler Nukleinsäurereplikation beeinträchtigen.

Insbesondere bevorzugt sind Mittel in Form von Salben, wobei als Salbengrundlage eine lipophile Substanz benutzt wird. Vorzugsweise wird als Salbengrundlage Vaseline benutzt.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen und Mittel, die sie enthalten, eignen sich zur Behandlung von Virus-, Tumor- und Autoimmunerkrankungen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter, ohne sie jedoch zu beschränken.

Beispiel 1

Synergistische Steigerung der Hemmwirkung von Aciclovir auf die Vermehrung von Herpes simplex Viren durch das exo/exo-Isomer von Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-9yl-xanthogenat.

Menschliche Lungenkarzinomzellen (Calu-6) wurden mit 30 plaquebildenden Einheiten Herpes simplex Viren (Type-1, Stamm ANG) in Linbroplatten infiziert. Zwei Stunden nach der Infektion wurde Zellkulturmedium (MEM, mit 10 % fötalem Kälberserum, 0,85 g/l Natriumbikarbonat und 0,5 % Carboximethylzellulose), das entweder 0, 5 oder 10 µg/ml Exo/Exo-Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-9yl-xanthogenat (D609) enthielt, zugegeben. Gleichzeitig wurden die Kulturen mit Aciclovir behandelt. Alle Ansätze wurden 4-fach ausgeführt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C unter CO₂-Begasung (5 %) inkubiert. Nach Abkippen des Mediums wurden die Zellen mit 3 % Formalin fixiert und mit 0,5 % Kristallviolett gefärbt. Nach Trocknen bei Raumtemperatur wurde die Zahl der gebildeten Plaques bestimmt.

In den Kulturen ohne D609 wurden $32,75 \pm 11$ Plaques gezählt. In Anwesenheit von 5 oder 10 µg/ml D609 wurden 32 ± 3 Plaques und 33 ± 6 Plaques gezählt.

D.h. D609 hatte bei diesen Konzentrationen keinen Effekt auf die Plaquebildung. Bei einer Konzentration von $0,16 \mu\text{M}$ Aciclovir wurde die Zahl der Plaques auf 30 ± 11 reduziert. Dieser Effekt war nicht signifikant (Student's-t-Test $p = 0,4$).

In Anwesenheit von $10 \mu\text{g/ml}$ D609 wurde bei einer Konzentration von $0,16 \mu\text{M}$ Aciclovir die Zahl der Plaques auf $9,5 \pm 5,1$ reduziert. Dieser Effekt war signifikant (Student's-t-Test $p = 0,014$).

Die Ergebnisse sind in Figur 1 veranschaulicht, bei der die mittlere Anzahl der Plaques gegen die Konzentration Aciclovir aufgetragen ist. Die Messreihe ohne D609 ist als Quadrate, die Messreihe mit $5 \mu\text{g/ml}$ D609 als Kreise und die Messreihe mit $10 \mu\text{g/ml}$ D609 als Dreiecke eingezeichnet. Man sieht deutlich, dass in Anwesenheit von allein nicht wirksamen Konzentrationen D609 die Wirkung des Aciclovir bereits bei erheblich niedrigeren Konzentrationen einsetzt, bei denen Aciclovir allein keine Wirkung zeigt.

Beispiel 2

Steigerung der Wirkung von Aciclovir auf den Verlauf einer experimentellen Infektion mit Herpes simplex Viren in Mäusen durch das exo/exo-Isomer von Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-9yl-xanthogenat.

D609 wurde zusammen mit dem gleichen Gewichtsanteil Kaliumsalz der Decansäure und vier Gewichtsteilen Cholesterin im Mörser gemischt. Danach wurden Propylenglycol (Endkonzentration 10 %) und Vaseline zugegeben, so dass eine Konzentration von 5 % D609 erreicht war. Auf die gleiche Weise wurden Salben, die 5 % Aciclovir bzw. 5% D609 und 5 % Aciclovir enthielten, hergestellt. Analog wurde eine Placebo-Salbe hergestellt, die keinen der beiden Wirkstoffe enthielt.

Je 10 Mäuse (Stamm Balb-C) wurden am Oberschenkel rasiert und mit einer Kanüle auf einer Fläche von $5 \times 5 \text{ mm}$ 6 mal die Haut geritzt. Anschließend wurden

mit einem Wattestäbchen 50 µl einer HSV-1 Suspension (Stamm Wal, 10^8 plaque-bildende Einheiten/ml) aufgetragen. Vier Tage nach der Infektion wurde mit der Behandlung begonnen (2 mal täglich). Es wurden die Symptome "Ausgebreitete Läsionen", "Lähmungen der Hinterbeine" und das Überleben protokolliert.

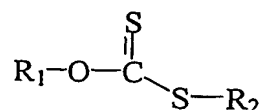
Das Ergebnis ist in den Figuren 2a bis 2d graphisch dargestellt. Aufgetragen ist die Anzahl der Tiere mit den entsprechenden Symptomen gegen die Anzahl der Tage nach der Infizierung. Dreiecke kennzeichnen jeweils die überlebenden Tiere, Quadrate die Tiere mit Lähmungen der Hinterbeine und Rauten die Tiere mit ausgebreiteten Läsionen.

Bei der Behandlung mit der Placebo-Salbe ohne Wirkstoff lässt sich in Figur 2a erkennen, dass nach 14 Tagen nur 3 Tiere überlebten und zuvor alle Tiere ausgebreitete Läsionen und 7 Tiere Lähmungen aufwiesen. In den Figuren 2b und 2c ist durch Behandlung mit D609 (2b) bzw. Aciclovir (2c) die Überlebensrate höher, Läsionen und Lähmungen werden fast vollständig geheilt. Bei der Kombination von D609 und Aciclovir in Figur 2d überleben alle Tiere, Läsionen und Lähmungen werden vollständig geheilt und treten auch in geringerem Ausmaß auf.

Das Kombinationspräparat ist somit deutlich besser wirksam als die Einzelpräparate. Mit dem Kombinationspräparat wird das Überleben aller Tiere sowie eine geringere Symptomatik und eine schnellere Abheilung der Symptome erreicht.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Formulierung, enthaltend ein Xanthogenat der Formel I



(I)

- wobei R₁ für einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Alkylrest steht und R₂ für ein Metallatom, eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Alkoxy-, Amino- oder Ammoniumgruppe oder Halogen steht, und einen Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation, sowie gegebenenfalls ein die Aktivität des Xanthogenats erhöhendes Adjuvans und einen die Reizwirkung reduzierenden Trägerstoff.
2. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** R₁ einen Adamantyl-, Norbornyl-, Tricyclodecyl-, Benzyl-, geraden oder verzweigten C₃-C₂₀-Alkyl-, C₃-C₂₀-Cycloalkyl-, Furyl-, Pyridyl-, Anthracyl-, Naphtyl-, Phenanthryl-, Perinaphtyl- oder Chinuclidinyl-Rest darstellt, wobei der obengenannte gerade oder verzweigte C₃-C₂₀-Alkylrest durch eine Hydroxyl-, eine C₁-C₄-Alkoxygruppe, ein Halogenatom oder eine Aminogruppe und der obengenannte C₃-C₂₀-Cycloalkylrest ebenfalls durch eine Hydroxyl-, eine C₁-C₄-Alkoxy- oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe, ein Halogenatom oder eine Aminogruppe substituiert sein können.
 3. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** R₁ ein Cyclododecyl-, Dodecyl-, Undecyl-, Decyl-, Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-decyl-, nonyl-, octyl-, Bicyclo[2,2,1]-heptyl-, Cyclohexyl-, Hexyl- oder Toluyrest ist.

4. Pharmazeutische Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** R₂ ein Natrium- oder Kaliumatom oder eine Dimethylglycylester- oder Methylestergruppe ist.
5. Pharmazeutische Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation ein Nukleosidanalogen ist.
6. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation ausgewählt ist unter Aciclovir, Valaciclovir, Penciclovir und Fanciclovir.
7. Pharmazeutische Formulierung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** je ein Teil Xanthogenat 1 bis 10, vorzugsweise 2 bis 4 Teile Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation enthalten sind.
8. Pharmazeutische Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Adjuvans ein ionisches Detergens, vorzugsweise eine Fettsäure mit 6 bis 19 C-Atomen oder ein Alkylsulfat mit 8 bis 18 C-Atomen enthalten ist.
9. Pharmazeutische Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Adjuvans Deoxycholinsäure oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon enthalten ist.
10. Pharmazeutische Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Adjuvans eine Phosphonsäure enthalten ist.
11. Pharmazeutische Formulierung nach Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** zusätzlich als Trägerstoff Cholesterin enthalten ist.

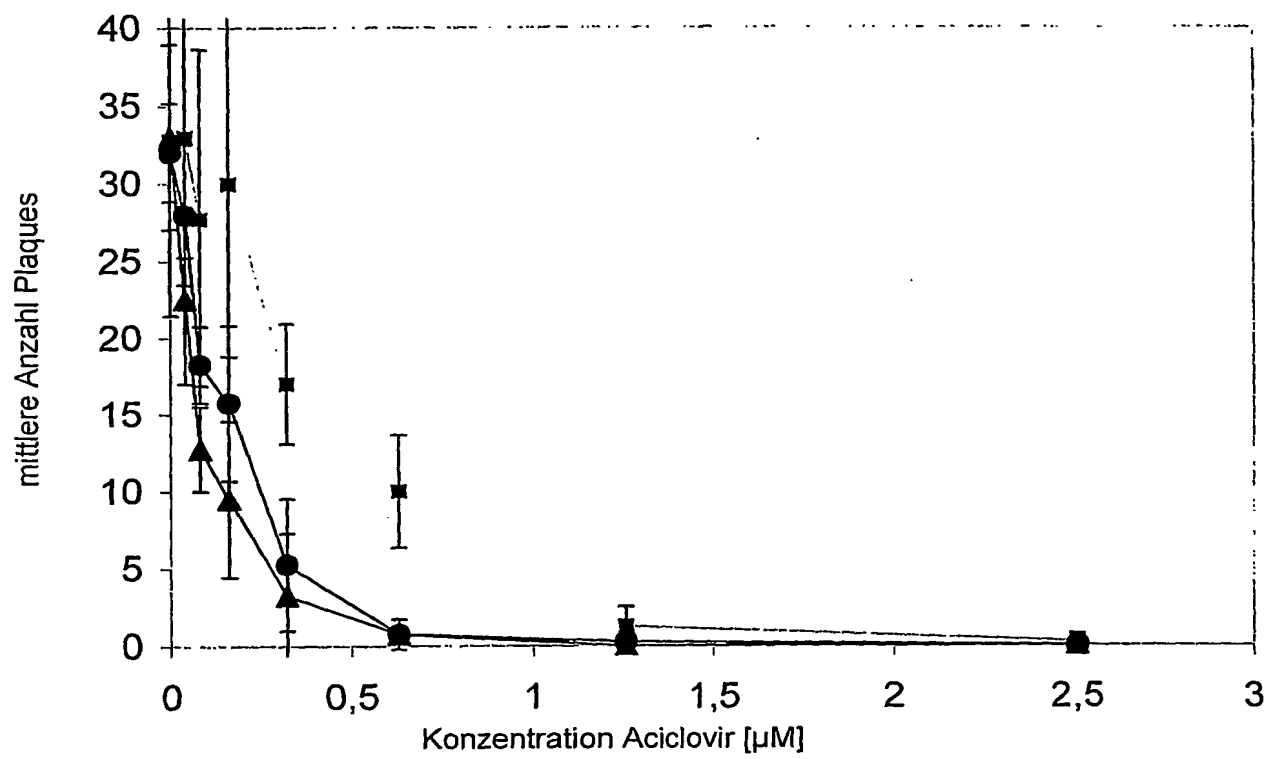
12. Mittel zur Behandlung von Virus-, Tumor- oder Autoimmunerkrankungen, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine pharmazeutische Formulierung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11 enthält.
13. Mittel nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass es Tricyclo[5,2,1,0^{2,6}]-decan-9-yl-xanthogenat als Xanthogenat, Cholesterin oder Phosphatidylcholin als Trägerstoff, das Natrium- oder Kaliumsalz der Decansäure als Adjuvans enthält und der Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation ausgewählt ist unter Aciclovir, Valaciclovir, Penciclovir und Famciclovir.
14. Mittel nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass es als Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation Aciclovir enthält.
15. Mittel nach indesten einem der Ansprüche 12-14, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** es ein Teil Xanthogenat, ein Teil Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation, vier Teile Trägerstoff und ein Teil Adjuvans enthält.
16. Mittel nach einem der Ansprüche 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** es eine Salbe ist, die die pharmazeutische Formulierung in einer lipophilen Substanz, vorzugsweise Vaseline, enthält.

Zusammenfassung

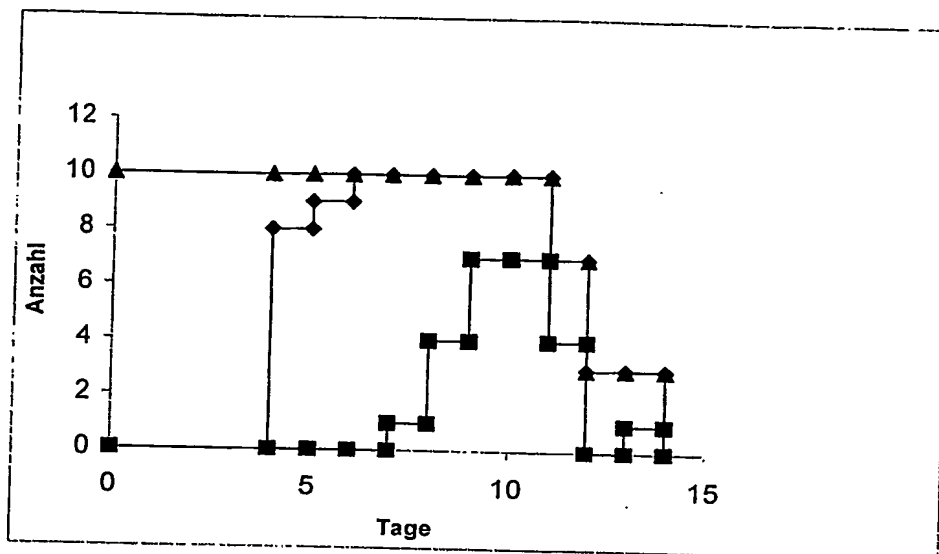
Die Erfindung betrifft pharmazeutische Formulierungen von Xanthogenaten und Mittel, die diese Formulierungen enthalten, zur Behandlung von Virus-, Tumor- oder Autoimmunerkrankungen. Die pharmazeutischen Formulierungen enthalten ein Xanthogenat der Formel I



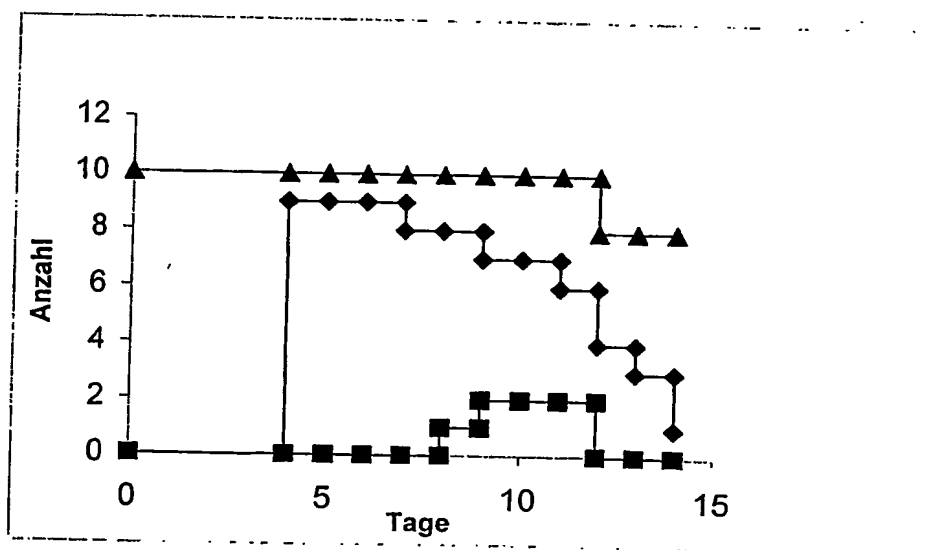
wobei R₁ für einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Alkylrest steht und R₂ für ein Metallatom, eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Alkoxy-, Amino-, oder Ammoniumgruppe oder Halogen steht, und einen Hemmstoff der viralen Nukleinsäurereplikation, sowie gegebenenfalls einen Trägerstoff, der die irritierende Wirkung des Xanthogenat reduziert und gegebenenfalls ein die Aktivität erhöhendes Adjuvans.



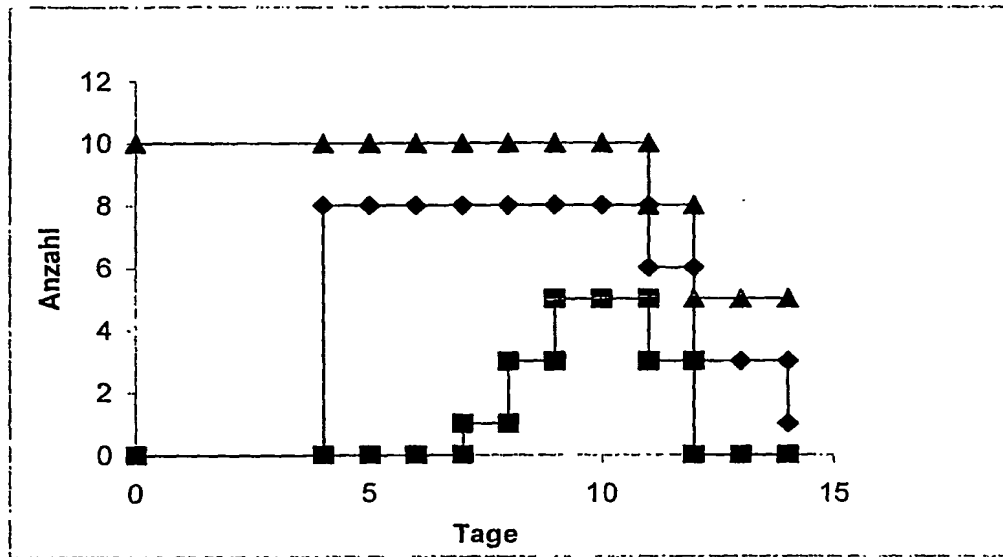
Figur 1



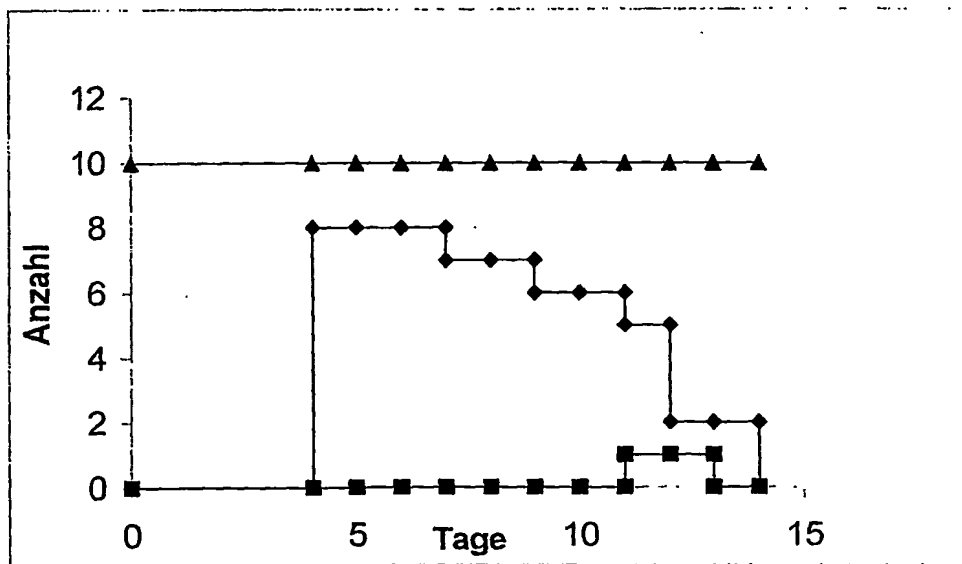
Figur 2a



Figur 2b



Figur 2c



Figur 2d

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.